

Was steckt wirklich in der Wurst?

Molekulargenetische Tierartendifferenzierung

Kerstin Röhlke, Paul Kamp und Norbert Grotjohann

Universität Bielefeld, Universitätsstr. 25, 33615 Bielefeld, kerstin.roellke@uni-bielefeld.de

Molekularbiologische Methoden wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese sind von zentraler Bedeutung im Lehrplan Biologie für die gymnasiale Oberstufe. Sie werden in vielfältigen Bereichen wie z. B. auch in der Lebensmittelanalyse angewendet. Hier kann mithilfe der molekulargenetischen Tierartendifferenzierung nachgewiesen werden, was wirklich in der Wurst steckt. Die theoretischen Hintergründe und die praktische Umsetzung dieses Themas werden im Folgenden so dargestellt, dass es im Schülerlabor und auch in der Schule bearbeitet werden kann.

Stichwörter: Lebensmittelanalyse, Molekulargenetische Tierartendifferenzierung, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

1 Einleitung

Viele Menschen verzehren gar kein Fleisch oder kein Fleisch bestimmter Tierarten. Diese Entscheidung kann ökologische, ethische, religiöse oder gesundheitliche Gründe haben: Der Konsum bisher üblicher Fleischmengen wird heute unter Berücksichtigung des ökologischen Fußabdrucks kritisch diskutiert. In Deutschland traditionell verarbeitetes Pferdefleisch wird inzwischen vielfach ambivalent betrachtet, da zu den Tieren heute deutlich stärker ein Bezug als Haustier denn als Nutztier besteht. Der Verzehr von Schweinefleisch ist sowohl nach islamischen als auch nach jüdischen Speisevorschriften verboten, im Hinduismus ist Rindfleisch mit einem Tabu belegt. Beim Kauf von Fertiggerichten oder Wurst sind bewusste Käufer daher auf die Inhaltsangaben der Hersteller angewiesen. Auf einer Verpackung müssen wichtige Verbraucherinformationen wie die Bezeichnung des Produktes, die Füllmenge, das Mindesthaltbarkeitsdatum, das Zutatenverzeichnis u.v.m. angegeben werden. Durch eine umfassende Gesetzgebung unter Beteiligung europäischer und deutscher Richtlinien (z.B. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2005; Europäisches Parlament, 2002) sollen die Bürger so vor Gesundheitsrisiken und Betrug geschützt werden. Häufige Lebensmittelskandale zeigen allerdings: Nicht immer ist drin, was drauf steht...

Im Frühjahr 2013 löste die Verwendung von nicht deklariertem Pferdefleisch anstelle von Rindfleisch in Fertigprodukten wie Lasagne und Hackfleischsaucen einen Lebensmittelskandal aus.

Außer der Empörung über den Betrug und der Gefahr von Gesundheitsrisiken stellt sich in der öffentlichen Diskussion auch die Frage, wie es möglich ist, sogar geringe Mengen von Verunreinigungen mit nicht auf der Verpackung deklarierten Tierarten nachzuweisen.

2 Lehrplanbezug

Bei der molekulargenetischen Tierartendifferenzierung werden in mehreren Arbeitsschritten typische molekulargenetische Methoden wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese durchgeführt, die z. B. in Nordrhein-Westfalen (NRW) abiturrelevant sind. Hier sieht der Kernlehrplan im Kompetenzbereich Erkenntnisgewinnung die Erläuterung „molekulargenetischer Verfahren (u. a. PCR und Gelelektrophorese) und ihrer Einsatzgebiete“ vor (MSW NRW, 2014, S. 40). Laut Beschluss der Kultusministerkonferenz zu den einheitlichen Prüfungsanforderungen in der Abiturprüfung Biologie sind die „Anwendungen moderner biologischer Erkenntnisse und Methoden, z. B. Gentechnologie, Reproduktionsbiologie, Biotechnologie“ bundesweit maßgeblich (KMK, 2004, S. 8). Die molekulargenetische Tierartendifferenzierung bietet einen geeigneten Kontext mit engem Bezug zur Lebenswelt von Schülerinnen und Schülern, um das Verständnis über die biologischen Hintergründe zu vertiefen sowie Kompetenzen zum Transfer, zur Anwendung und zur Bewertung zu entwickeln. Im Folgenden werden die fachlichen Hintergründe von zwei Analyseverfahren zur Tierartenuntersuchung in Lebensmitteln unter Anwendung der PCR vorgestellt.

Bei der Anwendung des amplifizierten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (aRFLP) werden nach der Extraktion der DNA aus den zu untersuchenden Fleischproben bei der PCR universelle Primer verwendet. Im Anschluss findet eine Restriktionsspaltung statt, um für die Tierarten spezifische Bandenmuster in der Gelelektrophorese zu erhalten. Bei der aFL-Methode dagegen werden in die PCR tierartenspezifische Primer eingesetzt. So entstehen nur dann PCR-Produkte, wenn die vorher durch die Auswahl der Primer definierten Tierarten in der Probe enthalten sind. Die Gegenüberstellung der Methoden soll zu einem Gesamtverständnis für diese Analyseverfahren führen.

3 Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism (aRFLP) - Restriktionsanalyse von amplifizierter DNA

Das gentechnische Verfahren der Restriktionsanalyse kann für verschiedene Bereiche wie Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung von DNA eingesetzt werden (Engels, 2009). Dabei wird die DNA von einem Restriktionsenzym gespalten, so dass mehrere Fragmente entstehen. Bei der Restriktionsspaltung zur Tierartendifferenzierung wird das Prinzip des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genutzt (Stüber, 2007). Dafür wird zunächst ein geeigneter Sequenzabschnitt mithilfe der PCR vervielfältigt. Hier werden Primer verwendet, die bei allen Tierarten den gleichen Bereich amplifizieren, so dass DNA-Fragmente der gleichen

Länge entstehen. Die Unterschiede in den Amplifikaten der verschiedenen Tierarten müssen also in einem weiteren Schritt herausgefunden werden. Dies geschieht durch Restriktionsspaltung (Stüber, 2007). Zwischen den verschiedenen Tierarten bestehen durch Mutationen bedingte Unterschiede in der Basenabfolge. So können Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wegfallen oder hinzukommen. Folglich entstehen durch die Restriktionsspaltung artspezifische DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Sie können durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Man erhält ein spezifisches Bandenmuster, das mit DNA-Profilen von Referenzproben abgeglichen werden kann (Engels, 2009; Stüber, 2007).

4 Amplified Fragment Length Analysis (aFL) - DNA-Amplifizierung mit tierartenspezifischen Primern

Bei dem Nachweis von Tierarten unter Anwendung spezifischer Primer werden DNA-Abschnitte untersucht, die eine hohe Diversität zwischen verschiedenen Spezies aufweisen, innerhalb der Tierart jedoch nicht variieren (Stüber, 2007). Es werden also Primer verwendet, die spezifisch an die DNA einer bestimmten Tierart binden. Aus diesem Grund kann nur ein PCR-Produkt gebildet werden, wenn die DNA des zugehörigen Tieres in der Probe vorhanden ist. Für die Entwicklung der Primer muss die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnittes bekannt sein. Um eine Probe gleichzeitig auf mehrere in Frage kommende Tierarten zu untersuchen, können Primermixe verwendet werden, die Primerpaare für mehrere Tierarten beinhalten (Stüber, 2007). Um eine eindeutige Unterscheidung zu gewährleisten, werden die Primer so designed, dass bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich große PCR-Produkte entstehen. Die Amplifikate können im Anschluss mittels Gelelektrophorese ausgewertet werden. Anhand der Größe des gebildeten PCR-Produktes kann eindeutig auf die entsprechende Tierart geschlossen werden.

Diesem Prinzip folgend wurden unter Verwendung verschiedener Gene (*Beta-Casein*, *Alpha-Aktin*, *Neuroglobin*, v. a. aber *Cytochrom B*) Untersuchungsprotokolle zu verschiedenen Tierarten (Strauß, Emu, Huhn, Pute, Schwein, Schaf, Kaninchen, Ente, Reh etc.) veröffentlicht (Stüber, 2007). Durch eine Vielzahl an Firmen sind kommerzielle Testkits für eine große Palette von Spezies erhältlich (Stüber, 2007). Durch den Einsatz der Realtime-PCR kann auch eine Quantifizierung der beinhalteten Tierarten erfolgen (Eurofins Deutschland, 2018; Stüber, 2007).

Ein Vergleich der aRFLP- mit der aFL-Methode ist auf Arbeitsblatt 2 in Abbildung 2 dargestellt.

5 Das *Cytochrom B*-Gen – ein geeigneter DNA-Abschnitt zur Tierartendifferenzierung

Um verschiedene Spezies zu unterscheiden, wird häufig ein Abschnitt der mitochondrialen DNA (mtDNA) untersucht (Stüber, 2007). Diese eignet sich aus mehreren Gründen besonders gut: Sie

liegt bereits in großer Menge vor, da Zellen – je nach ihrer Funktion – Tausende von Mitochondrien besitzen können und diese wiederum jeweils 2 - 10 DNA-Moleküle aufweisen (Knippers, 2015). Außerdem wird mtDNA cytoplasmatisch vererbt, die Nachkommen erhalten das mitochondriale Genom von Mutter (Knippers, 2015). Es findet also kein Austausch von mütterlichen und väterlichen Erbinformationen statt. Durch die fehlende Rekombination elterlichen Erbgutes sind genetische Veränderungen seltener. Außerdem können durch Heterozygotie bedingte Analyseprobleme ausgeschlossen werden (Stüber, 2007). Gleichzeitig ist die Mutationsrate des mitochondrialen Genoms etwa zehnmal höher als im Zellkern. Mögliche Erklärungsansätze sind im Vergleich zum Zellkern weniger effiziente Reparatursysteme in den Mitochondrien und auch die in der Atmungskette entstehenden Hydroxylradikale, die mutagen wirken können (Knippers, 2015).

Die fast immer ringförmigen mitochondrialen DNA-Moleküle der verschiedenen Organismengruppen weisen sehr unterschiedliche Größen auf. In den Zellen höherer Pflanzen kann das mt-Genom bis zu 2 Millionen Basenpaare umfassen, tierische mtDNA ist mit 16 000 bis 20 000 Basenpaaren (bp) am kleinsten (Knippers, 2015). Die ca. 16 500 bp von Säugetieren besitzen 2 Gene für rRNAs, 22 Gene für tRNAs und 13 Gene, die Proteine kodieren (vgl. Abb. 1). Letztere sind allesamt an der Atmungskette beteiligt (Knippers, 2017, S. 222).

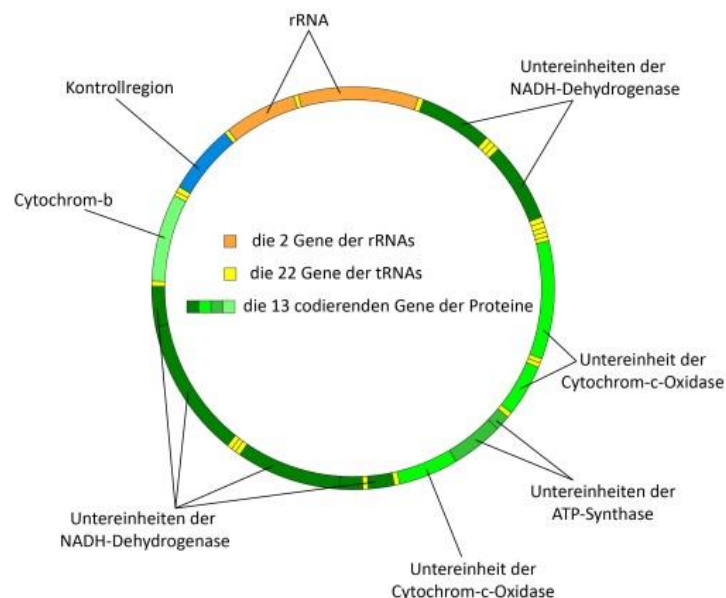


Abbildung 1: Die mitochondriale DNA des Hausrindes (*Bos taurus*) umfasst 37 Gene

Eines der proteincodierenden Gene der mtDNA ist das *Cytochrom B* (*cytB*)-Gen. Durch Cytochrome wird der schrittweise Elektronentransport in der Atmungskette gewährleistet, die frei gewordene Oxidationsenergie dient der Synthese von ATP. Das Cytochrom B (CytB)-Protein ist Bestandteil des Elektronentransportkomplexes III in der Mitochondrienmembran (Campbell et al., 2016, S. 223–227) (vgl. Abb. 2).

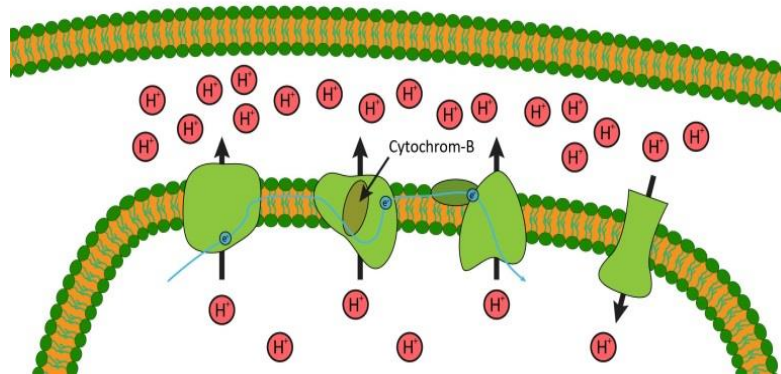


Abbildung 2: Das Cytochrom B-Protein ist an der Elektronentransportkette in der inneren Membran des Mitochondriums beteiligt

Das *cytB*-Gen umfasst 1140 Basenpaare, die für 380 Aminosäuren kodieren. Die Basenabfolge des *cytB*-Gens weist kaum intraspezifische, aber deutliche interspezifische Unterschiede auf. Es eignet sich daher gut als Markergen zur Identifikation von Spezies (Zehner, Zimmermann & Mebs, 1998) sowie für phylogenetische Untersuchungen (Irwin, Kocher & Wilson, 1991; Kocher et al., 1989). Das Gen verfügt über stärker konservierte Regionen und variablere Regionen (vgl. Arbeitsblatt 2, Abb. 1). So variieren die Aminosäuren des Transmembranproteins innerhalb der Membran am stärksten und an der inneren Oberfläche der Membran stärker als an der äußeren Oberfläche (Irwin et al., 1991).

In diversen Arbeitsgruppen wurden verschiedene Primer auf ihre Tauglichkeit getestet, über möglichst große Organismengruppen hinweg einen einheitlich großen Abschnitt des *cytB*-Gens zu amplifizieren (Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989; Zehner et al., 1998). Diese Primer binden in konservierten Regionen des *cytB*-Gens. Die anschließende Analyse ist abhängig von der Fragestellung. Beim Design tierartenspezifischer Primer dagegen werden variable Bereiche des *cytB*-Gens als Bindungsstelle für die Primer ausgewählt.

6 Tierartendifferenzierung in der Praxis

6.1 Tierartendifferenzierung im Schülerlabor *teutolab*-biotechnologie

Im Schülerlabor *teutolab*-biotechnologie können Biologiekurse der gymnasialen Oberstufe Experimentiertage zu aktuellen biotechnologischen Analytiken durchführen. Dabei wenden sie abiturrelevante molekulargenetische Methoden an und erhalten Einblicke in interdisziplinäre Laborarbeit. Ein beliebtes Thema ist ‚Was steckt wirklich in der Wurst? – Molekulargenetische

Tierartendifferenzierung. Hier gehen Schülerinnen und Schüler der Frage nach, welche Tierart in einer Wurstprobe verarbeitet wurde. Dafür vergleichen sie eine unbekannte Wurstprobe mit Referenzproben von Schweine-, Rind-, Puten- und Pferdefleisch. Aufgrund der Anwendung abiturrelevanter Inhalte kann die Beantragung der Exkursion zum Schülerlabor durch den Mehrwert für den Unterricht gut begründet werden. Das *teutolab*-biotechnology dient als klassisches Schülerlabor der Ergänzung des Unterrichts und der Breitenförderung (Haupt et al., 2013). Den Lehrkräften wird zur Vorbereitung ein Schülerskript mit Informationen über Inhalt, Versuche und theoretische Hintergründe zur Verfügung gestellt. Alternativ kann auch die Homepage genutzt werden. Hier sind sowohl Basis- als auch weiterführende Informationen verlinkt, die je nach Interesse angeklickt werden können. Ein Kurzfilm gewährt einen ersten Einblick ins Thema. Die Einbindung des Schülerlaborbesuches in den Unterricht ist notwendig, wenn über einen Schulausflug hinaus ein Mehrwert für das naturwissenschaftliche Verständnis erzielt werden soll (Pawek, 2012; Runge, Stiefs & Schecker, 2013; Streller, 2016). Die Nachbereitung im Unterricht wird angeregt, indem die angefärbten und digitalisierten Gelbilder der Teilnehmer nach Beendigung des Praktikums online verfügbar gemacht werden. Die mögliche Auswertung wird im Schülerlabor exemplarisch anhand bereits vorliegender Gelbilder besprochen. Zur Nachbereitung wird außerdem ein Set aus optional einsetzbaren Arbeitsblättern, die sich eng am Versuchstag orientieren, angeboten. Die Arbeitsblätter zu diesem Beitrag dagegen führen Schülerinnen und Schüler so in die Thematik ein, dass zur Bearbeitung kein Schülerlabor aufgesucht werden muss. Zur umfassenderen Aufarbeitung des Themas kann auch die Homepage des *teutolab*-biotechnology genutzt werden.

Die im Folgenden näher erläuterten Versuchsschritte führen die Biologiekurse im Schülerlabor in Zweier- bis Dreiergruppen selbst durch. Um den Schülerinnen und Schülern möglichst viele selbstständige Arbeitsschritte zu ermöglichen, wird im *teutolab*-biotechnology die aRFLP-Methode praktisch durchgeführt. Die Besprechung der alternativen aFL-Methode zum Vergleich kann der Vertiefung und dem Transfer dienen, bietet in der praktischen Durchführung jedoch keinen weiteren Erkenntnisgewinn, da die Methoden – bis auf die fehlende Restriktionsspaltung – dieselben sind. Durch die detaillierte Darstellung sollen interessierte Lehrkräfte sowie weitere Schülerlabore die Möglichkeit erhalten, dieses Thema ebenfalls selbst umzusetzen oder für den Unterricht nachzuvollziehen.

6.2 DNA-Extraktion

Mit Einmal-Gewebestanzten wird zunächst eine kleine Menge von tiefgekühlten Fleisch- und Wurstproben entnommen (vgl. Abb. 3). Der Gewebeaufschluss geschieht im *teutolab*-biotechnology durch alkalische Lyse. Dazu werden die Proben in eine Lösung gegeben, die Natronlauge (NaOH) und Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält (Jurk, 2009). Die Proben werden zwei Minuten lang bei 20 °C und acht Minuten lang bei 98° C inkubiert. Durch das Zusammenwirken von alkalischem pH-Wert, Detergens und hoher Temperatur werden die Zellmembranen aufgebrochen und die DNA wird freigesetzt. Um diese von den anderen

Bestandteilen der Zelle zu trennen, werden die Proben zentrifugiert. Dabei entsteht ein Zell-Pellet, das die schwereren Zell-Fragmente enthält. Im Puffer bleiben somit die restlichen DNA-Fragmente sowie einige leichte Zellorganellen zurück. Diese können abpipettiert und weiter verwendet werden (vgl. Abb. 4).



Abbildung 3: Mit Gewebestanden werden aus tiefgefrorenen Proben geringe Mengen zur Untersuchung entnommen

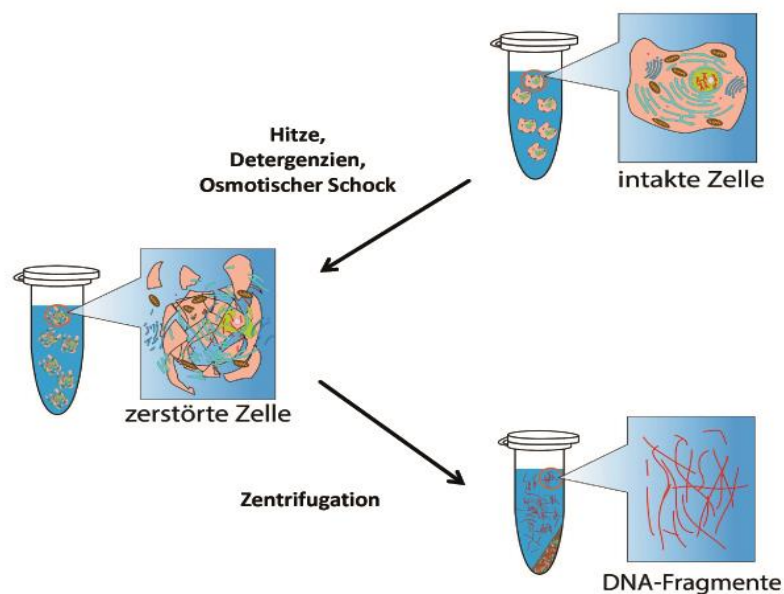


Abbildung 4: Die Zellen werden durch Hitze, Detergenzien und osmotischen Schock lysiert und die DNA nach der Zentrifugation aus dem Überstand entnommen

6.3 PCR

Die extrahierte DNA wird in einem Verhältnis von 1:10 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt und als Template in den PCR-Reaktionsmix eingesetzt. Im *teutolab*-biotechnologie wird der 5x HOT FIREPol Blend Master Mix (Ready to Load) der Firma Solis BioDyne verwendet. Er enthält

Desoxyribonukleotide der verschiedenen Basen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), HOT FIREPol DNA-Polymerase, Proofreading Enzyme und einen PCR-Puffer. Zusätzlich ist er bereits mit Ladepuffer für die Gelelektrophorese versetzt (Solis BioDyne, 2018). Die Primermixe wurden anhand der in einer Datenbank (National Center for Biotechnology Information) verfügbaren Basensequenzen der verschiedenen Tierarten selbst designed. Bei der aRFLP-Methode wird mit Primern für konservierte Bindestellen bei allen Tierarten eine einheitliche Sequenz von 688 bp Größe amplifiziert. Für die aFL-Methode wurden spezifische Primer für die untersuchten Tierarten entwickelt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Primer aufgeführt.

Tierart	Basensequenz	Fragmentgröße
aRFLP-Methode: Primermix (10 µmolar)		
Alle Spezies	For: AGCTACGGTCATCACAAATCTAC Rev: GGCCCCTAGAATGTCTTTAATA ¹	688 bp
PCR-Programm: 13 min. 95 °C, 32 Zyklen (15 sec. 95 °C, 10 sec. 55 °C, 25 sec. 70 °C), 5 min. 70 °C		
aFL-Methode: Primermix aus 4 Primerpaaren (jeweils 10 µmolar)		
Schwein	For: AGCTACGGTCATCACAAATCTAC Rev: GGCCCCTAGAATGTCTTTAATA	272 bp
Rind	For: TCCCATACATCGGCACAAATT Rev: TGGGATTTTGTCTACGTCTGAG	200 bp
Pute	For: CCCTCATAGCAACAGCCTTTGTA Rev: GGAATGGGATTTTGTCTAGCGTT	297 bp
Pferd	For: CACAGTTATAGCTACAGCATTCATG Rev: GTAGGAGCAAGATCAGGAG	356 bp

PCR-Programm:

13 min. 95 °C, 30 Zyklen (15 sec. 95 °C, 10 sec. 55 °C, 25 sec. 70 °C), 5 min. 70 °C

Tabelle 1: Im *teutolab*-biotechnologie entwickelte Primer und PCR-Programme

Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA kann laut Literaturangaben in einem Temperaturbereich von bei 90 – 95 °C geschehen (Schmidt & Rothhämel, 2012). Die Hybridisierungstemperatur sollte über 50 °C liegen und ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer. Die Schmelztemperatur (T_m) wird von den mit der Primersynthese beauftragten Firmen mitgeliefert, kann aber auch mit einem im Internet verfügbaren T_m

¹ Anmerkung: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, M: A oder C, K: G oder T, W: A oder T, R: A oder G, Y: C oder T

Calculator (ThermoFisher Scientific, 2018) berechnet werden. Bei dieser Temperatur sind 50 % der betrachteten DNA-Moleküle denaturiert. Die Hybridisierungstemperatur wird für gewöhnlich 5 °C unter der Schmelztemperatur gewählt, damit die Primer nur an ihre vollständig komplementären Basensequenzen binden. Zu niedrige Temperaturen führen zu unspezifischen Hybridisierungen, zu hohe Temperaturen führen zu einer geringen Ausbeute an PCR-Produkten. Die Anzahl der Zyklen kann zwischen 25 und 35 liegen, die Versuche im *teutolab*-biotechnologie ergaben eine zufriedenstellende Amplifikation bei 30 bzw. 32 Zyklen. Die vorgeschalteten 13 Minuten bei 95 °C dienen sowohl der Aktivierung der chemisch inhibierten Hot Start Polymerase als auch der initialen Denaturierung der DNA-Templates. Laut Literatur werden 5 Minuten bei 72 °C zur abschließenden Elongation nachgeschaltet (Schmidt & Rothhämel, 2012). Im *teutolab*-biotechnologie wurde diese Temperatur erfahrungsbasiert auf 70 °C gesenkt.

Für die PCR werden besonders dünnwandige, kleine Reaktionsgefäße (Strips) verwendet. Zu jeweils 4 µl Mastermix werden 14 µl Primermix, 2 µl steriles Aqua dest. und 2 µl der verdünnten DNA-Probe pipettiert. Außer den vier Referenztierarten und der Wurstprobe wird eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser anstelle des DNA-Templates angesetzt. Abbildung 5 zeigt Schülerinnen beim Pipettieren des PCR-Reaktionsmixes.



Abbildung 5: Schülerinnen pipettieren im *teutolab*-biotechnologie den Reaktionsmix für die PCR zusammen

6.4 Restriktionsspaltung

Im Anschluss an die PCR werden die Amplifikate bei der aRFLP-Methode zehn Minuten lang mit dem Restriktionsenzym *Tsp5091* (auch unter dem Namen *TasI* erhältlich) verdaut. Es handelt sich um ein FastDigest® Enzym von Thermo Scientific mit besonders kurzer Reaktionszeit und einem Temperaturoptimum von 65 °C (Thermo Scientific, 2014). Für einen erfolgreichen Restriktionsverdau werden geeignete Restriktionspuffer benötigt. Diese enthalten im Allgemeinen Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) zur Stabilisierung des pH-Wertes, MgCl₂, NaCl oder KCl sowie ein Sulfhydrylreagens zur Stabilisierung der Enzyme. Ein divalentes Kation ist für die Enzymaktivität notwendig (Engels, 2009). *Tsp5091* hat die Erkennungssequenz AATT (Thermo Scientific, 2014). Dieses Enzym wurde gewählt, da es bei den im Schülerlabor untersuchten Tierarten zu distinkt unterscheidbaren DNA-Fragmenten führt. Außerdem können durch die kurze Inkubationszeit Wartezeiten im Praktikumsablauf vermieden werden. Abbildung 6 zeigt exemplarisch für Rind und Pferd die Restriktionsschnittstellen innerhalb des mit universellen Primern amplifizierten DNA-Fragmentes. Darüber hinaus sind die für die spezifischen Primer ausgewählten komplementären Sequenzen und der entsprechend vervielfältigte DNA-Abschnitt markiert.

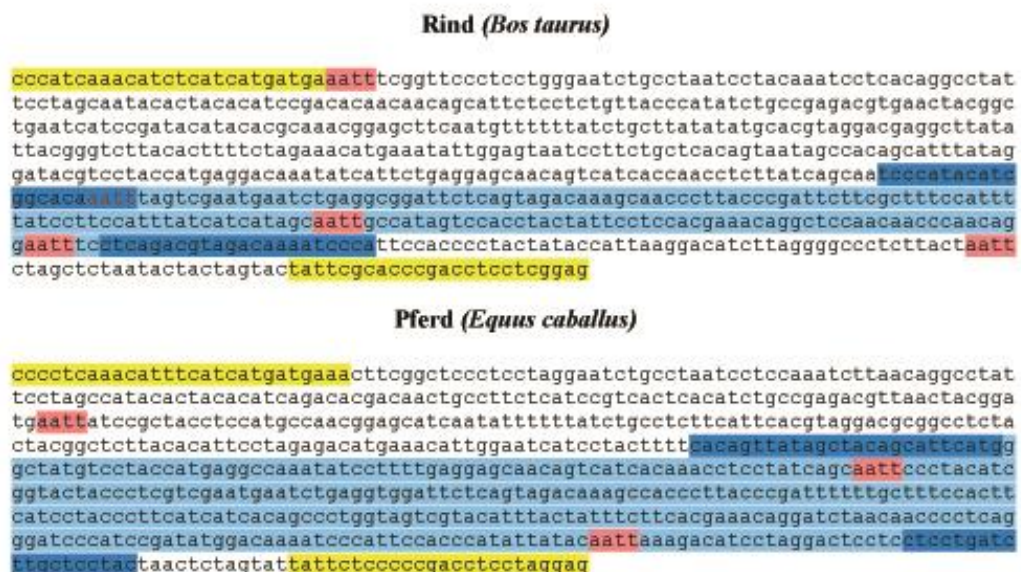


Abbildung 6: Restriktionsschnittstellen für *Tsp5091* innerhalb der mit universellen Primern amplifizierten DNA-Fragmente von Rind und Pferd sowie komplementäre Sequenzen für spezifische Primer (gelb: Hybridisierungs-Sequenzen für universelle Primer, rot: Erkennungssequenzen)

6.5 Gelelektrophorese

Jeder Tischgruppe stehen im Schülerlabor für die Auswertung ihrer Proben acht Taschen im Agarosegel zur Verfügung. Die zu untersuchende Wurstprobe wird mit den Referenzproben von

Schwein, Rind, Pute und Pferd abgeglichen. Außerdem wird eine Spur für die Positivkontrolle benötigt – hier wird die ungespaltene DNA einer Tierart aufgetragen. Eine weitere Tasche wird mit der Negativkontrolle der PCR befüllt (sie enthält keine DNA), eine letzte Tasche dient dem Auftragen des Längenstandards. Hier wird der Low Range Gene Ruler der Firma Thermo Scientific verwendet. Er enthält 10 DNA-Fragmente von 25 bis 700 bp Größe (Thermo Scientific, 2016). Es wird ein 3 % iges Agarosegel verwendet, da anhand der Anzahl und der Lage der Erkennungssequenzen für *Tsp5091* relativ kleine DNA-Fragmente zu erwarten sind. Laut Literatur können durch die Variation der Agarosekonzentration DNA-Fragmente von 100 – 60 000 Basen separiert werden; für eine Agarosekonzentration von 2 % wird ein Trennbereich von 100 bis 2000 Basen angegeben (Dechert, 2012). Im *teutolab*-biotechnologie wird das Agarosegel daher hoch konzentriert verwendet und eine Stunde lang 110 Volt Spannung angelegt. Abbildung 7 zeigt die am Spannungsgeber angeschlossene Elektrophoresekammer.

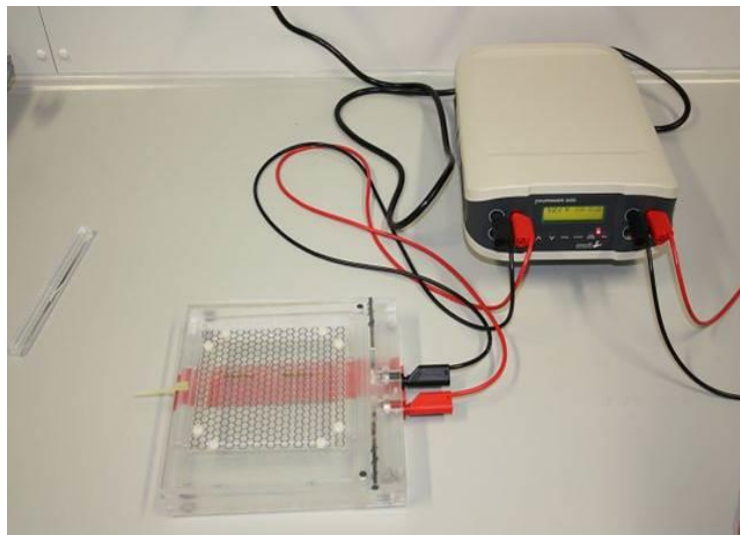


Abbildung 7: Die Auftrennung der DNA-Fragmente geschieht in einem 60-minütigen Gelelektrophoreselauf bei 110 Volt unter Verwendung eines 3 % igen Agarosegels

6.6 Anfärbung der DNA

Im Schülerlabor *teutolab*-biotechnologie wird die DNA 20 Minuten lang mit Gelred™ angefärbt. Diese Alternative zu dem klassischerweise verwendeten Ethidiumbromid weist ebenfalls eine aromatische Molekülstruktur auf. Gelred™ dringt nicht in Zellmembranen ein und wird daher weder als toxisch noch als mutagen eingestuft. Unter Anregung durch UV-Licht emittiert in die DNA eingelagerter Farbstoff oranges Licht in einem ähnlichen Spektralbereich wie Ethidiumbromid (500 - 600 nm Wellenlänge) (Biotium, 2018; Dechert, 2012). Die Moleküle auf gleicher Höhe leuchten auf und ergeben ein DNA-Bandenmuster, das digitalisiert wird.

6.7 Auswertung der Gelbilder

Das DNA-Profil der untersuchten Probe kann mit den DNA-Profilen der Referenzproben verglichen werden und so auf die beinhaltete Tierart zurück geschlossen werden. In Abb. 8 sind die aufgrund der bekannten Sequenzen theoretisch zu erwartenden DNA-Fragmente für Schwein, Rind, Pute und Pferd dargestellt.

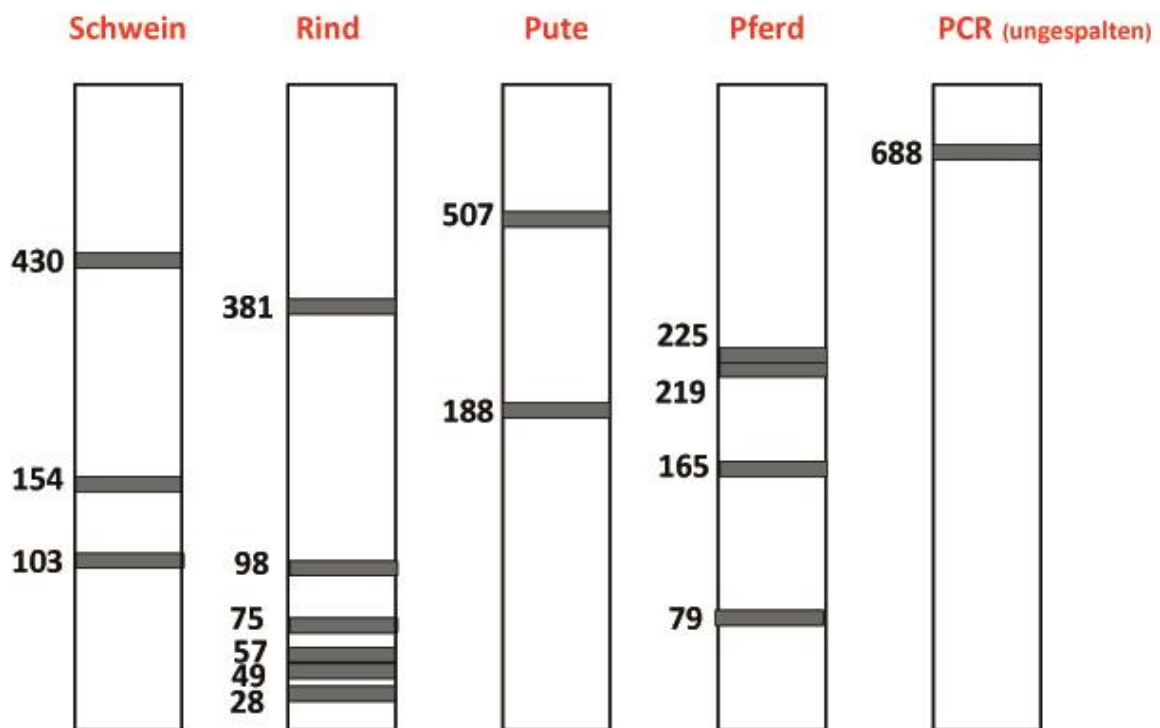


Abbildung 8: Theoretisch zu erwartende DNA-Fragmente für Schwein, Rind, Pute und Pferd

Die Abbildungen 1 und 2 auf Arbeitsblatt 1 zeigen die Gelbilder von Wurstanalysen zwei verschiedener Schülergruppen im *teutolab*-biotechnologie. Beim Rindfleisch haben die in Abb. 8 aufgeführten kleinsten Fragmente zu einer einzigen Bande geführt, beim Pferdefleisch haben das 225 bp- und das 219 bp-Fragment eine gemeinsame Bande ergeben. Im Schülerlabor werden exemplarisch auch Gelbilder besprochen, bei denen die gewünschten Banden durch verschiedene mögliche Fehlerquellen nicht erzielt wurden. Dies können beispielsweise eine fehlgeschlagene PCR oder Restriktionsspaltung oder auch Fehler beim Auftragen der Proben aufs Gel sein. So verfügen die Biologiekurse bereits über eine Wissensgrundlage zur Analyse ihrer eigenen Probe im nachfolgenden Unterricht.

Für Biologiekurse, die kein Schülerlabor aufsuchen können, wurde der Kontext in Arbeitsblatt 1 und 2 so aufgearbeitet, dass er im Unterricht umgesetzt werden kann.

Arbeitsblatt 1

Was ist in der Wurst? Auswertung von DNA-Profilen zur molekulargenetischen Tierartendifferenzierung

Beim Pferdefleischskandal im Jahr 2013 wurden in verschiedenen Ländern Europas als Rindfleischprodukte deklarierte Lebensmittel gefunden, die Pferdefleisch enthielten. Tiefkühlkost und Soßen mit Hackfleisch waren dabei am meisten betroffen. Um zu bestimmen, welche Tierarten wirklich in unserer Wurst enthalten sind, kann man die Methode der molekulargenetischen Tierartendifferenzierung anwenden. Dazu untersucht man bestimmte Sequenzabschnitte der DNA. Für die Lebensmittelanalyse wird zunächst die DNA aus den Zellen extrahiert. Bei der folgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein Bereich eines geeigneten Gens, der bei allen Tierarten gleich lang ist, stark vervielfältigt. Innerhalb des Gens gibt es durch Mutationen bedingte Unterschiede zwischen den Tierarten. Nun nutzt man den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus: Durch die anschließende Restriktionsspaltung der durch die PCR erhaltenen Fragmente entstehen je nach Tierart unterschiedlich viele und unterschiedlich lange Teilstücke. Diese artspezifischen DNA-Fragmente können durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit bekannten Referenzproben können die Tierarten in den Proben identifiziert werden (vgl. Abb. 1).

Aufgabe 1

Abbildung 1 zeigt ein Gelbild zur molekulargenetischen Tierartendifferenzierung. Neben den Referenzproben von Schwein, Rind, Pute und Pferd ist die Wurstprobe aufgetragen. Der Längenstandard ist eine Mischung aus DNA-Fragmenten bekannter Größe (vgl. Abb. 3) und wird zur Größenbestimmung der untersuchten DNA-Fragmente genutzt. Die Positivkontrolle enthält ungespaltene DNA einer Referenzprobe aus der PCR, für die Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von tierischen DNA in die PCR eingesetzt. Hinweis: Die in der PCR verwendeten Primer gehören zur Stoffklasse der Nukleinsäuren. Diese Oligonukleotide werden ebenso wie DNA im Gelbild sichtbar.

- 1.1 In jeder Spur des Gelbildes ist unten eine Bande auf etwa gleicher Höhe zu sehen. Worum könnte es sich handeln?
- 1.2 In jeder Spur des Gelbildes ist oben eine Bande auf etwa gleicher Höhe zu sehen. Worum könnte es sich handeln?
- 1.3 Wie viele Banden sind – nach Abzug der unteren und der oberen Bande – jeweils bei den vier Referenzproben zu sehen?
- 1.4 Um welche Tierart handelt es sich bei der Wurstprobe in Abbildung 1? Begründen Sie Ihre Entscheidung.

Aufgabe 2

Um welche Tierart handelt es sich bei der Wurstprobe in Abbildung 2? Begründen Sie!

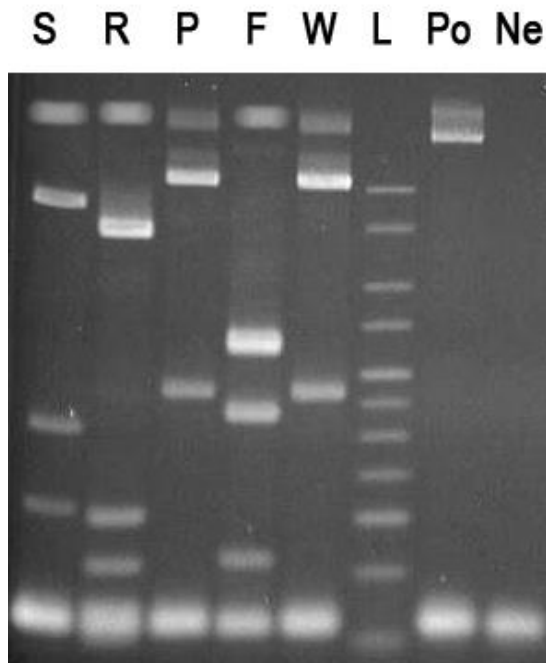


Abb 1: Gelbild 1 zur molekulargenetischen Tierartendifferenzierung einer Wurstprobe
(S: Schwein, R: Rind, P: Pute, F: Pferd, W: Wurst, L: Längenstandard, Po: Positivprobe, Ne: Negativprobe)

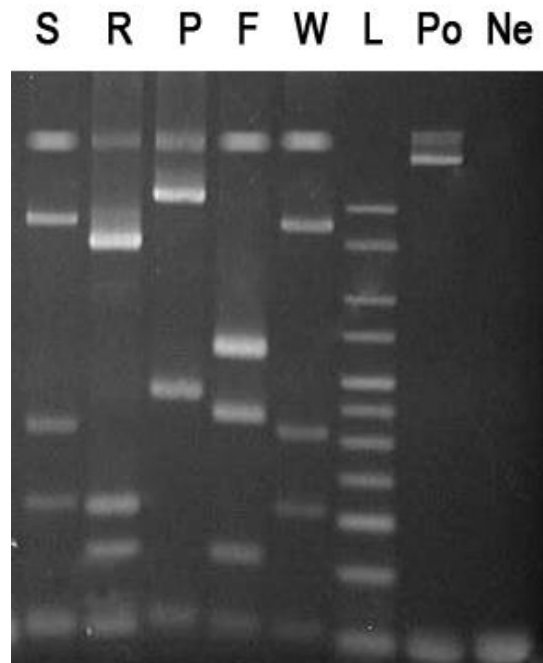
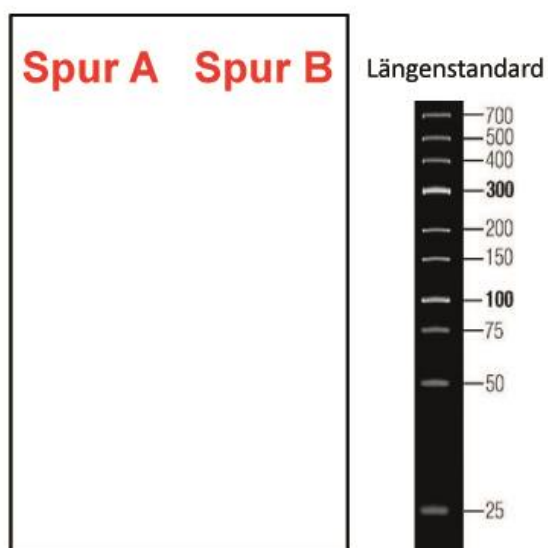


Abb. 2: Gelbild 2 zur molekulargenetischen Tierartendifferenzierung einer Wurstprobe
(S: Schwein, R: Rind, P: Pute, F: Pferd, W: Wurst, L: Längenstandard, Po: Positivprobe, Ne: Negativprobe)

Aufgabe 3



Skizzieren Sie in Spur A das Bandenmuster eines mit Pferdefleisch verunreinigten Rindfleischproduktes, in Spur B das Bandenmuster eines mit Schweinefleisch verunreinigten Rindfleischproduktes. Verwenden Sie dazu den daneben stehenden Längenstandard und die Informationen aus Abbildung 1 und 2.

Abb. 3: Zeichnungsfläche für Probe A und B mit nebenstehendem Längenstandard

Arbeitsblatt 2

Nicht immer ist drin, was drauf steht ...

Molekulargenetische Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik

Aus ethischen, religiösen oder gesundheitlichen Gründen verzichten viele Menschen auf den Verzehr von Fleisch bestimmter Tierarten. In der heutigen Konsumgesellschaft mit dem steigenden Umsatz von Fertigprodukten zeigen Lebensmittelskandale allerdings: Nicht immer ist drin, was drauf steht...

Durch Lebensmittelkontrollen wird die Einhaltung von Gesetzen zum Schutz der Käufer überprüft. Ein wichtiges Gebiet in der Lebensmittelüberwachung ist die Tierartendifferenzierung in verarbeiteten Nahrungsmitteln mit molekularbiologischen Methoden. Durch die Entwicklungen in der modernen Biotechnologie lassen sich Typisierungen durchführen, die auf dem Genotyp des zu untersuchenden Materials beruhen. Die mitochondriale DNA (kurz mtDNA), das Erbgut der Mitochondrien, hat sich hierfür als besonders geeignet erwiesen. Sie bietet mehrere Vorteile: mtDNA liegt bereits in großer Menge vor, da Zellen – je nach ihrer Funktion – Tausende von Mitochondrien besitzen können und diese wiederum jeweils 2 - 10 DNA-Moleküle aufweisen können. Außerdem wird mtDNA mütterlicherseits vererbt und liegt haploid vor, es findet also keine Rekombination von mütterlichem und väterlichem Erbgut statt. Für die Unterscheidung von Tierarten wird häufig das *Cytochrom B (cytB)*-Gen verwendet. Innerhalb dieses Gens gibt es Bereiche, bei denen Mutationen häufiger oder seltener nachweisbar sind (vgl. Abb. 1).

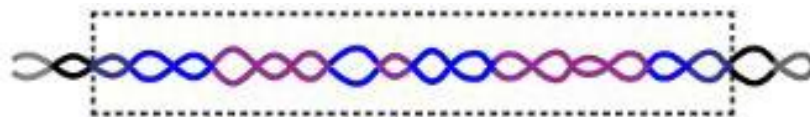


Abb. 1: Konservierte (blau) und variable Bereiche (violett) des *cytB*-Gens

Es ergeben sich daher zwei verschiedene Möglichkeiten, Tierarten zu unterscheiden:

1. aRFLP-Methode (Restriktionsanalyse von amplifizierter DNA)

Ein großer Teil des *cytB*-Gens wird mithilfe der PCR vervielfältigt. Dies geschieht durch den Einsatz eines geeigneten Primerpaares, das bei allen Tierarten an die gleichen komplementären Basen bindet. So entstehen PCR-Produkte mit derselben Länge. Unterschiede zwischen den Tierarten müssen in einem nachfolgenden Schritt sichtbar gemacht werden. Dies geschieht durch Restriktionsspaltung mit geeigneten Enzymen. Durch Mutationen entstehen leichte Änderungen in der Basenabfolge der DNA. So können Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen im *cytB*-Gen verschiedener Tierarten entstehen oder wegfallen. Man erhält unterschiedlich viele und

unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Diese können mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, sichtbar gemacht und den einzelnen Arten zugeordnet werden.

2. aFL-Methode (DNA-Amplifizierung mit tierartenspezifischen Primern)

Der Nachweis von Tierarten kann auch unter Verwendung tierartenspezifischer Primer erfolgen. In der aFL-Analyse werden Regionen der *cytB*-DNA verwendet, die zwischen den untersuchten Tierarten variieren. Es werden also Primer eingesetzt, die nur an die DNA einer bestimmten Tierart binden. Aus diesem Grund kann nur ein PCR-Produkt gebildet werden, wenn die DNA des dazu gehörigen Tieres in der Probe vorhanden ist. Für das Primer-Design muss daher die Sequenz bekannt sein. Als Bindungsstelle für die Primer werden Bereiche im *cytB*-Gen ausgewählt, die sich zwischen den Tierarten leicht in der Basenabfolge unterscheiden und zu PCR-Produkten mit unterschiedlicher Länge führen. Aufgrund der unterschiedlichen PCR-Produkte kann man in einem PCR-Ansatz Primermixe verwenden, die Primer für mehrere Tierarten beinhalten. Die vervielfältigten DNA-Abschnitte können im Anschluss durch Gelelektrophorese und Auswertung der Gelbilder identifiziert werden. Anhand der Größe des gebildeten PCR-Produktes kann eindeutig auf die entsprechende Tierart geschlossen werden. Abbildung 2 zeigt den schematischen Vergleich der aRFLP-Methode mit der aFL-Methode.

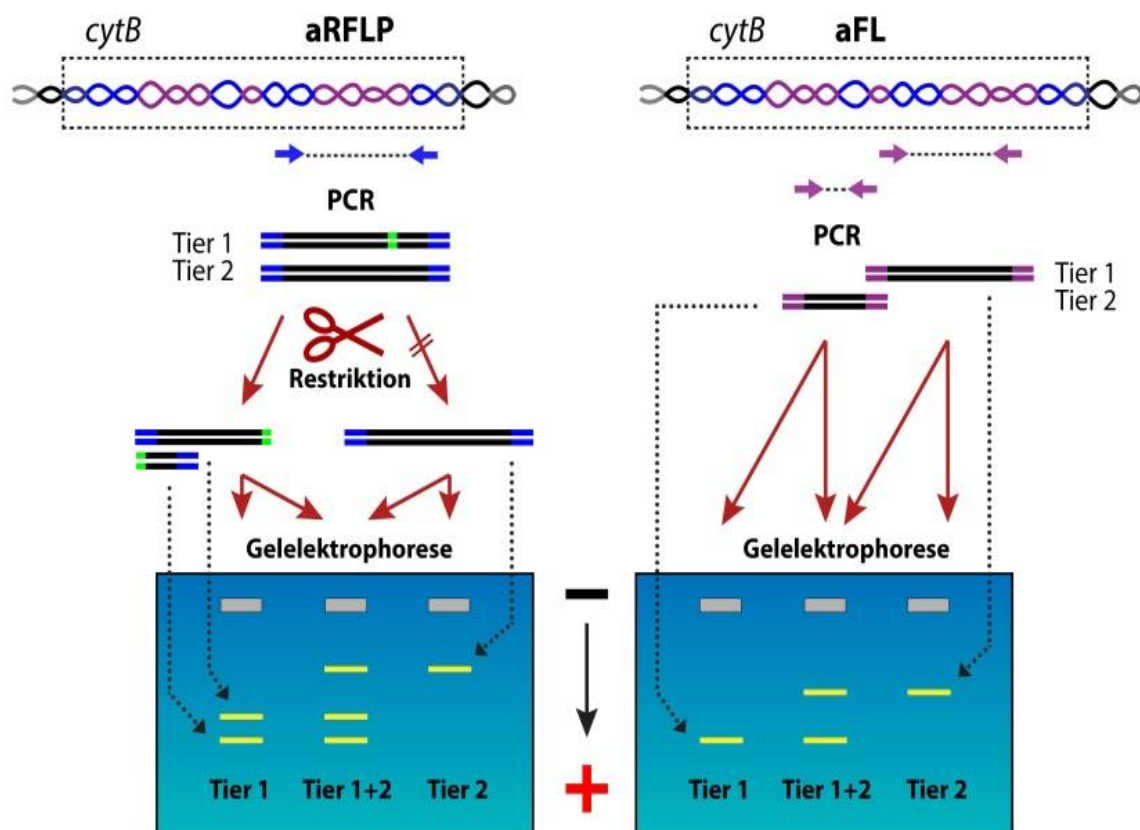


Abb. 2: Vergleich der aRFLP- Methode mit der aFL-Methode

Aufgabe 1

- 1.1 Beschreiben Sie kurz die wichtigsten Merkmale der aRFLP-Methode und der aFL-Methode zur Tierartendifferenzierung.
- 1.2 Stellen Sie stichwortartig die Vorteile und die Nachteile beider Methoden dar.
- 1.3 Benennen Sie Unterschiede und Gemeinsamkeiten von weiteren Ihnen bekannten Anwendungsfeldern für die PCR und die Gelelektrophorese.

Aufgabe 2

Abbildung 3 zeigt ein schematisches Gelbild aus einem Labor, das für das Bundesamt für Verbraucherschutz arbeitet. Es wurden Rinderhackproben verschiedener Anbieter untersucht. Beantworten Sie dazu folgende Fragen für den Laborbefund:

- 2.1 Woran kann man erkennen, welche Tierart verarbeitet wurde?
- 2.2 Wie groß sind die Fragmente der Tierarten, auf die getestet wurde (vgl. dazu mit dem Längenstandard)?
- 2.3 Welche Tierarten wurden in den Fleischproben 1, 2, 3 und 4 verarbeitet?
- 2.4 Eine Probe liefert ein unerwartetes Ergebnis. Begründen Sie, welche Ursachen es dafür geben könnte.

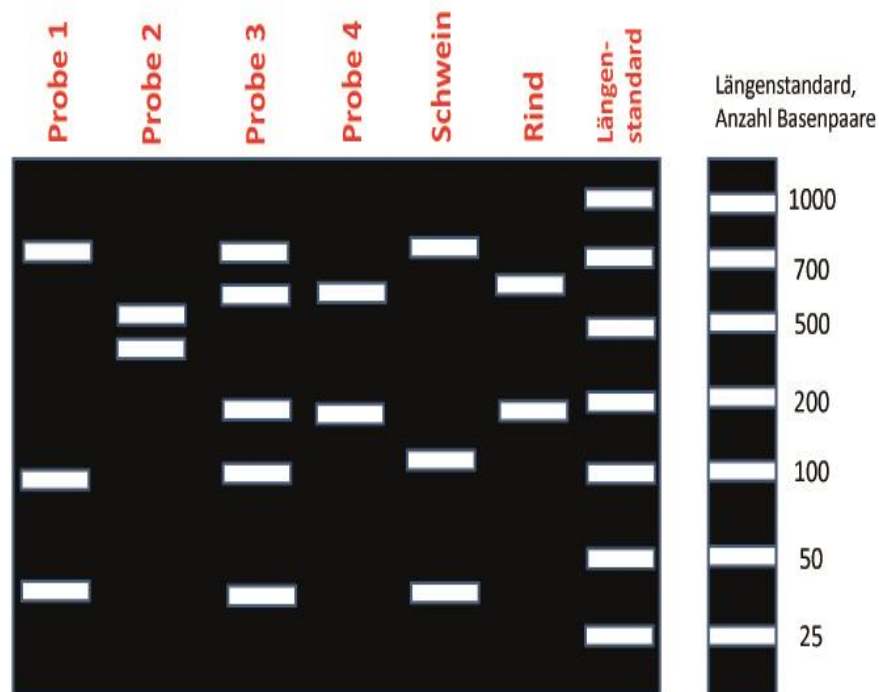


Abb. 3: Schematisches Gelbild verschiedener Lebensmittelproben

Lösungen der Arbeitsblätter

AB 1 Aufgabe 1

1.1 Es handelt sich um die Primer. Diese 15 - 25 Basen umfassenden Oligonukleotide werden ebenso wie die DNA angefärbt und somit als Banden im unteren Bereich des Gels sichtbar.

1.2 Es handelt sich um ungespaltene PCR-Produkte, d. h. die PCR-Produkte wurden noch nicht allesamt vollständig gespalten.

1.3 Schwein: 3 Banden, Rind: 3 Banden, Pute: 2 Banden, Pferd: 3 Banden.

1.4 Es handelt sich um reine Putenwurst, da bei der Wurstprobe ebenso wie bei dem Putenfleisch außer den Primern und der ungespaltenen DNA 2 Banden auf der gleichen Höhe zu sehen sind.

AB 1 Aufgabe 2

Es handelt sich um reine Schweinewurst, da bei der Wurstprobe ebenso wie bei dem Schweinefleisch außer den Primern und der ungespaltenen DNA 3 Banden auf der gleichen Höhe zu sehen sind.

AB 1 Aufgabe 3

In Spur A müssen 5 Banden, in Spur B müssen 6 Banden eingezeichnet werden.

AB 2 Aufgabe 1

1.1 Bei beiden Methoden wird das mitochondriale *cytB*-Gen untersucht. Bei der aRFLP-Methode werden in der PCR universell bei allen Tierarten bindende Primer verwendet. Die dadurch entstehenden gleich großen DNA-Fragmente werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, so dass für jede Tierart spezifische Teilfragmente entstehen. Diese können mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Bei der aFL-Methode werden in der PCR tierartenspezifische Primer verwendet. So entsteht nur ein PCR-Produkt, wenn das entsprechende Tier in der Probe vorhanden ist.

1.2

aRFLP-Methode:

Vorteile: Auch in der Probe unerwartete Tierarten führen zu einem DNA-Profil. Universelle Primer binden auch bei Tierarten, deren Basensequenz noch unbekannt ist.
Nachteile: Im Labor ist ein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig. Durch den Mehraufwand für Material- und Personalkosten ist die Analyse teurer. Außerdem erhält man das Untersuchungsergebnis erst später.

aFL-Methode:

Vorteile: Schneller und preisgünstiger als die aRFLP-Methode, da ein Arbeitsschritt weniger notwendig ist.

Nachteile: Die Proben können nur auf Tierarten geprüft werden, für die Primer in den Reaktionsmix für die PCR eingesetzt werden. Diese Methode eignet sich nur, wenn die Basensequenzen der Tierarten bekannt sind.

1.3 Zum Beispiel genetischer Fingerabdruck in der Kriminalistik:

Gemeinsamkeit: Geeigneter DNA-Abschnitt wird mithilfe der PCR vervielfältigt und die PCR-Produkte werden unter Einsatz der Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die Übereinstimmungen mit Referenzproben werden analysiert.

Unterschied: Einzelne Personen sollen unterschieden werden, d. h. hier sollten die Unterschiede nicht zwischen verschiedenen Arten, sondern zwischen Individuen der Art *Homo sapiens* gezeigt werden. Dafür muss ein DNA-Abschnitt verwendet werden, bei dem häufigere Mutationen nachweisbar sind.

AB 2 Aufgabe 2

2.1 Man kann an der Anzahl und der Lage der Banden erkennen, welche Tierart verarbeitet wurde.

2.2 Schwein: 50 und 300 Basenpaare, Rind: 200 und 700 Basenpaare.

2.3 Probe 1: Schwein, Probe 2: Weder Schwein noch Rind, Probe 3: Schwein und Rind, Probe 4: Rind.

2.4 Probe 2 zeigt eine Bande, die weder dem Profil von Schwein noch dem von Rind zugeordnet werden kann. Es handelt sich um eine Tierart, auf die nicht getestet wurde. Zur Identifikation müssen weitere Tierarten als Referenz verwendet werden.

7 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

Biotium (2018) *Product Information. GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X*.

Zugriff am 17.10.2018. Verfügbar unter <https://biotium.com/wp-content/uploads/2015/02/PI-41002-41003.pdf>

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2005). Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch. Zugriff am 17.10.2018.

Verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/LFGB.pdf>

Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. et al. (2016) *Campbell Biologie* (bio, 10., aktualisierte Auflage).

Hallbergmoos/Germany: Pearson.

Dechert, U. (2012). Gelelektrophoresen. In M. Jansohn & S. Rothhämel (Hrsg.),

Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor (5. Auflage, S. 37–93). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Engels, J. W. (2009). Restriktionsanalyse. In F. Lottspeich & J. W. Engels (Hrsg.),

Bioanalytik (2., [aktualisierte und erw.] Aufl., [Nachdr.], S. 563–700). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Eurofins Deutschland (2018) *Kits für die Identifizierung von Tierarten*. Zugriff am 11.09.2018. Verfügbar unter <https://www.eurofins.de/kits-de/tierarten/>

Europäisches Parlament (2002). Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Zugriff am 17.10.2018. Verfügbar unter [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:de:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:de:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:de:PDF)

Haupt, O. J., Domjahn, J., Martin, U., Skiebe-Corrette, P., Vorst, S., Zehren, W. et al. (2013). Schülerlabor - Begriffsschärfung und Kategorisierung. *MNU*, 66, 324–330.

- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128–144.
- Jurk, M. (2009). Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren. In F. Lottspeich & J. W. Engels (Hrsg.), *Bioanalytik* (2., [aktualisierte und erw.] Aufl., [Nachdr.], S. 633–651). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- KMK (Hrsg.) *Einheitliche Prüfungsanforderungen in der Abiturprüfung Biologie - Beschluss der Kultusministerkonferenz vom 01.12.1989 i.d.F vom 05.02.2004*.
- Knippers, R. (2015). Gene in Mitochondrien und Chloroplasten. In A. Nordheim & R. Knippers (Hrsg.), *Molekulare Genetik* (10., vollständig überarb. und erw. Aufl., S. 422–442). Stuttgart: Thieme.
- Knippers, R. (2017) *Eine kurze Geschichte der Genetik* (2. Auflage). Berlin: Springer.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. et al. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- MSW NRW (2014) *Kernlehrplan für die Sekundarstufe II Gymnasium/Gesamtschule in Nordrhein-Westfalen - Biologie*, MSW NRW. Schriftenreihe Schule in NRW. Zugriff am 14.12.2017. Verfügbar unter https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/upload/klp_SII/bi/GOST_Biologie_Endfassung.pdf
- Pawek, C. (2012). Schülerlabore als nachhaltig das Interesse fördernde außerschulische Lernumgebungen. In D. Brovelli, K. Fuchs, R. v. Niederhäusern & A. Rempfler (Hrsg.), *Kompetenzentwicklung an außerschulischen Lernorten. Tagungsband zur 2. Tagung Außerschulische Lernorte der PHZ Luzern vom 24. September 2011* (Außerschulische Lernorte - Beiträge zur Didaktik, Bd. 2, S. 69–94). Wien: LIT Verlag.
- Runge, K., Stiefs, D. & Schecker, H. (2013). Wirkungen schulischer Vorbereitung auf den Besuch des DLR_School_Lab. *LeLamagazin*, 3–5.
- Schmidt, H. & Rothhämel, S. (2012). Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In M. Jansohn & S. Rothhämel (Hrsg.), *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, S. 135–171). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Solis BioDyne (2018) *5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load. Data Sheet.*

Zugriff am 17.10.2018. Verfügbar unter

https://www.sbd.ee/EN/products/blend_mm_ready_to_lo/blend_mm_rtl_7_5

Streller, M. (2016) *The educational effects of pre and post-work in out-of-school laboratories.* Dissertation. Technische Universität Dresden, Dresden.

Stüber, E. J. (2007) *Drei kommerzielle Testkits zur Tierartenidentifikation in Fleischerzeugnissen im Vergleich.* Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Thermo Scientific (2014) *FastDigest TAS I. Product Information.* Zugriff am

17.10.2018. Verfügbar unter

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012549_FastDigest_TasI_UG.pdf

Thermo Scientific (2016) *Thermo Scientific GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use. Product Information.* Zugriff am 17.10.2018. Verfügbar unter

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013037_GeneRuler_LowRange_DNALadder_RTU_UG.pdf

ThermoFisher Scientific (2018) *Tm Calculator.* Zugriff am 17.10.2018. Verfügbar

unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

Zehner, R., Zimmermann, S. & Mebs, D. (1998). RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 111, 323–327.